



CONFIRMAÇÃO DE QUEBRA DE RESISTENCIA A DOENÇA AZUL DO ALGODOEIRO NAS SAFRAS 2006, 2007 E 2008

Tatiane da Franca Silva (UFRJ/ tatianedaf Franca@yahoo.com.br), Régis Lopes Corrêa (UFRJ), Yamá Castilho (UFRJ), Nelson Suassuna (EMBRAPA CNPA), Pierre Silvie (CIRAD/Coodetec), Jean Louis Bélot (CIRAD/Coodetec), Paulo Aguiar (Fundação Mato Grosso) e Maite Vaslin de Freitas Silva (UFRJ).

RESUMO: A doença azul (DA) do algodoeiro é uma doença importante do algodão do cerrado brasileiro, acarretando grandes perdas econômicas. Trata-se de uma virose associada ao polerovirus Cotton leafroll dwarf virus (CLR DV) e transmitida pelo pulgão *Aphis gossypii*, de forma persistente e circulativa. Em função da relevância da doença, a partir do final da década de 90, variedades suscetíveis passaram a ser substituídas por variedades resistentes a DA. Entretanto, a partir da safra 2006, relatos de campos de variedades resistentes onde algumas plantas apresentavam sintomas da DA passaram a ocorrer. Nos dois anos consecutivos a ocorrência de tais eventos sofreu um espalhamento e na última safra, ocorreram eventos em São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Neste trabalho foram analisadas plantas de quatro variedades resistentes distintas (BRS Cedro, Delta Opal, CD406 e FMT701), coletadas em campos de algodão dos estados de Goiás e Mato Grosso. O diagnóstico molecular positivo para infecção do CLR DV foi observado em todas as amostras analisadas, indicando a ocorrência de quebra de resistência em quatro variedades resistentes a doença azul. Análises dos fragmentos virais amplificados sugerem que duas substituições na proteína do movimento podem estar associadas ao fenômeno de quebra de resistência pelo CLR DV.

Palavras-chave: doença azul do algodoeiro, CLR DV, quebra de resistência, Cotton blue disease, virose

INTRODUÇÃO

As doenças representam importantes causas de perdas na cultura do algodão. A doença azul do algodoeiro é uma das principais doenças da cultura no Brasil. Sua ocorrência é registrada nas

principais regiões produtoras, gerando expressivas perdas econômicas. Em infecções severas registra-se a redução do tamanho e número dos órgãos florais, podendo, em alguns casos, serem abortados ou a planta apresentar esterilidade total (SANTOS, 1999). A virose é transmitida pelo pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii* Glover), e é associada no Brasil ao Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV), membro do gênero Polerovirus e da família Luteoviridae (CORRÊA et al., 2005).

As plantas afetadas apresentam sintomas de nanismo devido ao encurtamento dos entrenós, enrolamento e escurecimento foliar e amarelecimento das nervuras (CAUQUIL; VAISSAYRE, 1971). A transmissão pelo pulgão é de forma circulativa e persistente, ou seja, o vetor é capaz de reter o vírus por algum tempo, infectando várias plantas. Atualmente a principal medida de controle da moléstia é a utilização de variedades resistentes. No Brasil há diversas variedades resistentes, como BRS Cedro, Delta Opal, CD406 e FMT701, que são preferencialmente cultivadas em substituição às sensíveis. No entanto, devido ao alto potencial produtivo, algumas variedades suscetíveis ainda são utilizadas (SANTOS, 1999).

Estudos realizados em duas variedades resistentes (Delta Opal e CD406), com intuito de obter o padrão de herança, indicam que a característica está condicionada a um gene dominante, denominada de Rghv1 (*Resistance to gossypium hirsutum virus 1*) (PUJIM et al., 2008). Embora não existam estudos semelhantes em outras variedades, acredita-se que a resistência deva ser controlada pelo mesmo mecanismo observado em CD401 e Delta Opal (PUJIM et al., 2008).

Lavouras de algodão, formadas por cultivares sensíveis ou resistentes, estão sujeitas as infestações pelo pulgão *Aphis gossypii*, a incidência é registrada desde a emergência das plântulas até o estágio final do ciclo da cultura (SANTOS et al., 2004). O uso de cultivares sensíveis à virose exige um rígido controle do afídeo, capaz de transmitir o vírus em diferentes estágios do seu desenvolvimento (CAUQUIL; VAISSAYRE, 1971), enquanto que lavouras de cultivares resistentes suportam maiores infestações de insetos (SANTOS et al., 2004).

Recentemente, observações realizadas por diferentes fitopatologistas, em regiões e safras distintas, registram a ocorrência de possíveis focos da doença azul em campos de variedades resistentes. Plantas de diferentes variedades resistentes apresentando sintomas da doença azul foram inicialmente observadas em 2006, e desde então a frequência deste fenômeno tem aumentado a cada safra.

Com intuito de entender o padrão observado em campo, quinze amostras de variedades resistentes (BRS Cedro, Delta Opal, CD406) coletadas no estado de Goiás nos municípios de Ipameri e Acreúna foram analisadas através do kit de diagnóstico molecular, via RT-PCR, para a Doença Azul do

algodoeiro (DA). A presença do CLRDV foi confirmada em todas as amostras analisadas, indicando a ocorrência de quebra de resistência em todas as variedades. A análise dos fragmentos virais amplificados revela uma alta similaridade entre o isolado original do CLRDV e os obtidos em plantas resistentes. Entretanto, os resultados obtidos sugerem que alterações na proteína do movimento podem estar associadas a quebra de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito plantas de algodão das variedades resistentes BRS Cedro, Delta Opal, CD406 e FMT701 apresentando sintomas típicos da doença azul e, em alguns casos, apresentando também sintomas atípicos, caracterizado por sintomas típicos da DA e adicionalmente por folhas avermelhadas e caídas em telhado na parte mediana da planta) foram enviadas dos estados de Mato Grosso (distrito de Rondonópolis) e Goiás (distritos de Acreuna e Ipameri) (Tabela1).

Diagnóstico molecular por RT-PCR

RNA total das plantas foi extraído utilizando o kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 2.5 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA, a partir do iniciador O5R2 (Silva et al., 2008). Nested PCRs para a obtenção dos dois fragmentos virais (capsídeo e parte da polimerase e região intergênica) descritos por Silva e colaboradores em 2008 foram utilizados no diagnóstico de todas as amostras analisadas.

Sequenciamento e análise das sequências

Para o sequenciamento dos fragmentos purificados foram utilizados os oligonucleotídeos específicos CPR e CPF, para o capsídeo viral, e PL2F e PL2R, para parte da polimerase e região intergênica. As reações de sequenciamento foram feitas através do sequenciador automático Mega Bace. Os produtos do sequenciamentos foram comparados com o banco de dados do Genbank.

Sequências consenso do capsídeo, parte da polimerase e região intergênica foram obtidas através programa Multalin (Corpet, 1988). As análises de identidades das sequências protéicas foram realizadas utilizando o programa GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Para a análise das estruturas secundárias e das propriedades físico químicas da proteína do movimento foi usado o pacote de programas Lasergene (<http://www.dnastar.com/products/lasergene>).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Plantas de variedades resistentes de algodão apresentando sintomas da doença azul do algodoeiro ou virose foram identificadas em campo em 2 municípios de Goiás e 1 de Mato Grosso. Utilizando o diagnóstico molecular para a DA, foi possível amplificar a sequências gênicas do capsídeo e de parte da polimerase e região intergênica do CLRDV em todas as 18 amostras analisadas das variedades BRS Cedro, Delta Opal, CD406 e FMT701, coletadas nos estados de Goiás e Mato Grosso (Figura 1 e Tabela 1). O diagnóstico molecular positivo foi confirmado através do resultado do sequenciamento. As sequências do capsídeo e de parte da polimerase e região intergênica de todos os isolados apresentaram similaridade com as sequências do CLRDV depositada no Genbank (AY758560 e AY758561, respectivamente).

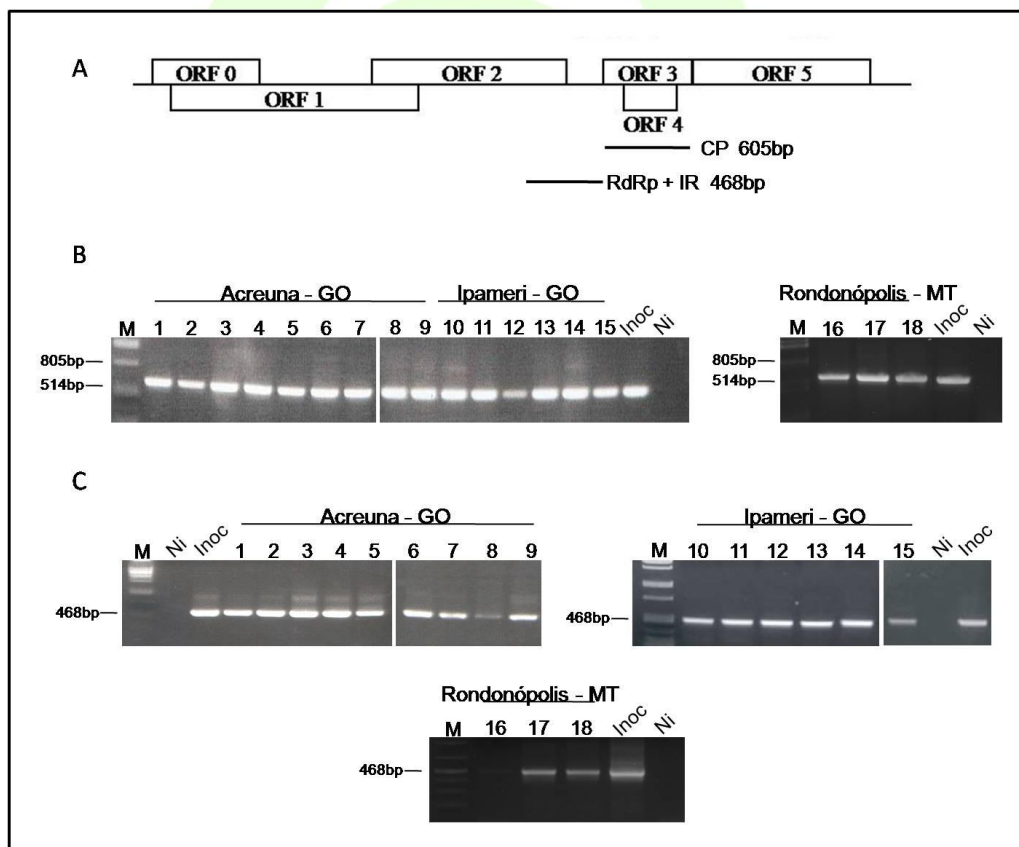


Figura 1: Detecção do CLRDV em plantas resistentes à DA. (A) Representação esquemática do genoma de *Polerovirus*, com a localização e tamanho dos fragmentos amplicados no CLRDV. (B) Amplificação da sequência gênica do capsídeo viral do CLRDV (606bp). (C) Amplificação da polimerase e região intergênica (468bp) do CLRDV. NI- Planta não infectada; Inoc – Planta susceptível inoculada (FM966); M- λ -DNA digerido com *Pst*I. Números de 1 a 9, 10 a 15 e 16 a 18 correspondem aos isolados Acr1 a Acr9, Ipa1 a Ipa6 e Ron1 a Ron2, respectivamente.

Tabela 1: Localização, variedade da planta hospedeira, nome dado ao isolado amplificado, data de coleta e sintomas das amostras analisadas.

Localização	Variedade	Isolado	Data	Sintoma ¹
Acreuna-GO	BRS Cedro	Acr1	2006	Atípico
Acreuna-GO	BRS Cedro	Acr2	2006	Típico
Acreuna-GO	BRS Cedro	Acr3	2006	Típico
Acreuna-GO	CD406	Acr4	2006	Atípico
Acreuna-GO	Delta Opal	Acr5	2006	Típico
Acreuna-GO	CD406	Acr6	2006	Típico
Acreuna-GO	Delta Opal	Acr7	2006	Típico
Acreuna-GO	CD406	Acr8	2006	Atípico
Acreuna-GO	CD406	Acr9	2006	Típico
Ipameri-GO	Delta Opal	Ipa1	2006	Típico
Ipameri-GO	Delta Opal	Ipa2	2006	Típico
Ipameri-GO	Delta Opal	Ipa3	2006	Típico
Ipameri-GO	Delta Opal	Ipa4	2006	Típico
Ipameri-GO	BRS Cedro	Ipa5	2007	Típico
Ipameri-GO	Delta Opal	Ipa6	2007	Típico
Rondonópolis- MT	FMT701	Ron1	2008	Típico
Rondonópolis- MT	FMT701	Ron2	2008	Típico
Rondonópolis- MT	FMT701	Ron3	2008	Típico

¹ Descrição dos sintomas: Típicos - nanismo devido ao encurtamento dos entrenós, enrolamento e escurecimento foliar e amarelecimento das nervuras; Atípico – sintomas típicos e adicionado o avermelhamento nas folhas.

Análises de identidade entre as sequências protéicas do capsídeo, de parte da polimerase e proteína do movimento do isolado original e dos obtidos em plantas resistentes, revelaram que os isolados associados a quebra de resistência são muito próximos ao isolado original do CLRDV. Valores de identidade de 97% a 100% foram encontrados para o capsídeo viral e para a proteína do movimento, e de 95% a 100% para a polimerase. Alinhamentos entre as sequências protéicas do capsídeo e polimerase dos isolados de quebra de resistência e o CLRDV original, não revelaram a ocorrência de substituições presentes em todos os isolados de quebra de resistência. Entretanto no alinhamento da proteína de movimento viral (traduzida a partir de um códon de iniciação interno á sequência do capsídeo) foi observada a presença de duas substituições (treonina por metionina, na posição 140, e metionina por isoleucina, na posição 167) localizadas na porção N-terminal da proteína (Figura 2).

		*	20	*	40	*	60	*	
CLRDV	:	MEEDDHVGATGVGKISQWLWSKPLGTHNAEDDEEEVVIGQEDAFLEDQELQARHLFSQKTVSREVPQDQSRSGRL	:	76					
Acr1	:	:	76					
Acr2	:	:	76					
Acr3	:	:	76					
Acr4	:	:	76					
Acr5	:I.....	:	76					
Acr6	:	:	76					
Acr7	:	:	76					
Acr8	:	:	76					
Acr9	:	:	76					
Ipa3	:	:	76					
Ipa4	:	:	76					
Ipa5	:	:	76					
Ipa6	:	:	76					
Ipa2	:	...EE.....	:	76					
Ipa1	:	:	76					
Ron1	:S.....	:	76					
Ron2	:	...E.....	:	76					
Ron3	:	:	76					
		80	*	100	*	120	*	140	*
CLRDV	:	YQIARHSAMECSRPTMNIIRSQWSYWSSSPRLQHPVPVPSLTWKVIHTVNCQFPYPPRLTNSESPTGGSNLRLSSMD	:	152					
Acr1	:M.....	:	152					
Acr2	:M.....	:	152					
Acr3	:M.....	:	152					
Acr4	:V.....F.....M..N.....	:	152					
Acr5	:M.....T.....	:	152					
Acr6	:M.....	:	152					
Acr7	:M.....T.....	:	152					
Acr8	:M.....	:	152					
Acr9	:L.....M.....	:	152					
Ipa3	:M.....T.....	:	152					
Ipa4	:M.....T.....	:	152					
Ipa5	:M.....T.....	:	152					
Ipa6	:M.....T.....	:	152					
Ipa2	:M.....T.....	:	152					
Ipa1	:F.....M.....LT.....	:	152					
Ron1	:M.....T.....	:	152					
Ron2	:F.....M.....	:	152					
Ron3	:M.....T.....	:	152					
		160	*						
CLRDV	:	RNGMTPPRTSSSESYIKAMVPRR	:	174					
Acr1	:T....H..	:	174					
Acr2	:T.....	:	174					
Acr3	:T.....	:	174					
Acr4	:T.....	:	174					
Acr5	:V.....T.....	:	174					
Acr6	:T.....	:	174					
Acr7	:T.....	:	174					
Acr8	:T.....	:	174					
Acr9	:T.....	:	174					
Ipa3	:T.....	:	174					
Ipa4	:T.....	:	174					
Ipa5	:T.....	:	174					
Ipa6	:T.....	:	174					
Ipa2	:T.....	:	174					
Ipa1	:T.....	:	174					
Ron1	:T.....	:	174					
Ron2	:T.....	:	174					
Ron3	:T.....	:	174					

Figura 2: Alinhamento entre as sequencias da proteína do movimento dos diferentes isolados de quebra de resistência e o isolado original do CLRDV. Duas substituições (Thr140Met e Ile167Thr) estão presentes em todos os isolados analisados.

A duas substituições presentes na proteína do movimento dos isolados de quebra de resistência geraram alterações na estrutura secundária, a presença de uma estrutura de α -hélice no

lugar de uma folha β encontrada na proteína do CLRDV original. Observam-se, ainda, pequenas alterações no índice de antigenicidade, na probabilidade de superfície (Figura 3) e no potencial fosforilação predito (dado não mostrado)

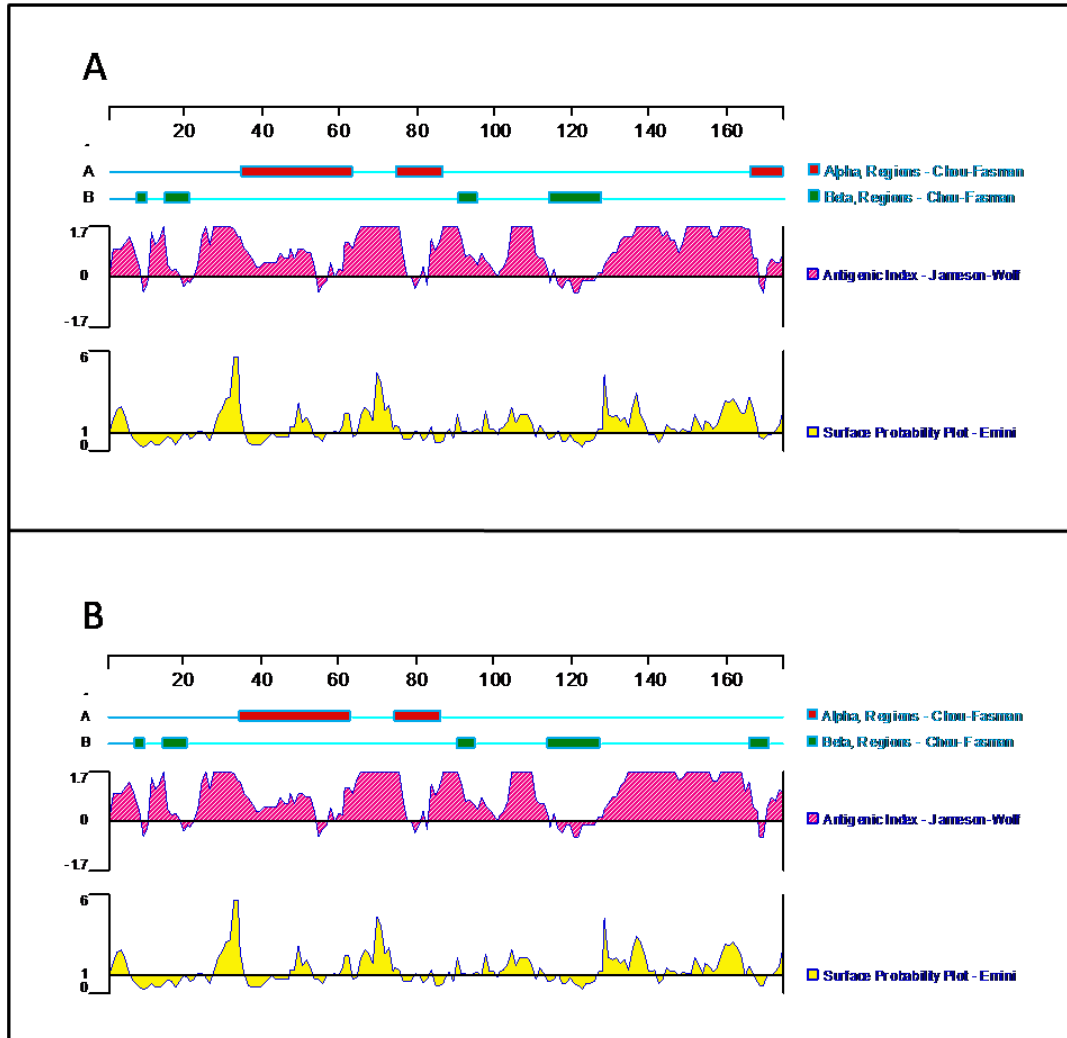


Figura 3: Análise da estrutura secundária, índices de antigenicidade e probabilidade de superfície da proteína do movimento do CLRDV original (A) e dos isolados de quebra de resistência (B).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho registram a ocorrência de infecções pelo CLRDV em 18 plantas de 4 variedades resistentes diferentes, confirmando a quebra de resistência observada em campo. Além disso, sugerem que as alterações observadas na proteína do movimento viral dos isolados obtidos podem estar associadas ao fenômeno de quebra de resistência.

Contribuição prática e científica do trabalho

A comprovação de que a resistência a DA foi quebrada em importantes variedades de algodão amplamente plantadas nas últimas safras representa uma importante preocupação ao plantio do algodão no Brasil. Estes resultados já estão permitindo uma melhor orientação dos produtores a adotarem medidas profiláticas de controle da doença azul mesmo em campo de variedades resistentes, além de fornecerem informações aos programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de novas variedades resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAUQUIL, J.; VAISSAYRE, M.. La "maladie bleue" du cotonnier en afrique : transmission de cotonnier à cotonnier par aphid gossypii glover. **Cotton et Fibres Tropicales** v. 6, p. 463-466. 1971.

CORPEL, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic. Acids. Res.** v. 16, p. 10881-10890, 1988.

CORRÊA, R. L.; SILVA, T. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARROSO, P. A.; VIDAL, M. S.; VASLIN, M. F. Molecular characterization of a virus from the family *Luteoviridae* associated with cotton blue disease. **Archives of Virology**, v. 150, p. 1357-1367, 2005.

PUPIM, O., SCHUSTER, I.; PINTO, R. B.; PIRES, E.; BELOT, J. L., SILVIE, P.; CHITARRA, L. G.; HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. Inheritance of resistance to cotton blue disease. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 43, n. 5, p. 661-665, 2008.

SANTOS, K. B. dos; NEVES, P. M. J.; SANTOS, W. J. dos. Resistência de cultivares de algodoeiro ao vírus do mosaico das nervuras transmitido pelo *Aphis gossypii* Clover (Homoptera: *Aphididae*). **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 4, p. 481-486 2004.

SANTOS, W. J. dos. Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. dos. **Cultura do Algodoeiro**. 1999. p. 133 -179.